Zeitschrift: Bulletin de la Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles = Bulletin der Naturforschenden Gesellschaft Freiburg

Herausgeber: Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles

Band: 81 (1992)

Heft: 1-2

Artikel: Routes et mécanismes du trafic vésiculaire des protéines à l'intérieur des cellules eukaryotes

Autor: Conzelmann, A.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-308712

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Routes et mécanismes du trafic vésiculaire des protéines à l'intérieur des cellules eukaryotes [1]

par A. CONZELMANN,
Institut de Biochimie de l'Université de Fribourg

Durant cette leçon, j'aimerais me pencher avec vous sur les aspects moléculaires de ce phénomène de biologie cellulaire appelé transport vésiculaire ou trafic vésiculaire (TV) [2], phénomène permettant aux cellules de notre corps d'exporter (= secréter) les nombreuses protéines destinées à fonctionner dans l'espace qui entoure les cellules. Si l'on feuillette l'index du JBC, *Journal of Biological Chemistry,* un périodique américain qui est parmi les plus lus dans ce domaine, on réalise que jusqu'en 1970 le TV et la sécretion n'étaient guère un sujet d'étude pour les biochimistes (un seul article paru entre 1953 et 1971). J'aimerais donc d'abord vous amener à une réflexion sur le changement des intérêts des biochimistes au cours des dernières années. A l'origine même de la biochimie, qui est l'étude de la chimie des organismes vivants, on retrouve une approche qui comporte les étapes suivantes: 1° Homogénéisation de l'organisme, 2° réalisation d'une mesure d'une réaction chimique dans cet homogénat (test *in vitro*), 3° purification des éléments nécessaires à cette réaction et 4° analyse de ces éléments. Cette procédure est devenue l'approche classique du biochimiste jusqu'à nos jours. Les premières étapes ont été franchies pour la première fois au début du siècle par les frères Buchner pour l'étude de la fermentation alcoolique. Ils ont pu démontrer qu'un extrait de levures homogénisées était capable de transformer le glucose en éthanol. Cette démonstration a anéanti les hypothèses antérieures selon lesquelles les réactions chimiques des organismes sont une émanation de l'état de vie et ne peuvent avoir lieu en dehors des organismes vivants. Ainsi, cette découverte a ouvert le chemin à la purification des catalyseurs de cette réaction et a amené à la découverte des protéines appelées enzymes. (Le terme purification dans ce contexte ne signifie que séparation des molécules nécessaires à une réaction chimique donnée de dizaines de milliers d'autres molécules contenues dans l'homogénat.) La structure de toute protéine consiste en une chaîne d'acides aminés dont la séquence précise est définie pour chaque protéine dans le génome de la cellule. Cette séquence va implicitement dicter la manière dont cette chaîne se repliera sur elle-même pour assumer une structure tridimensionnelle énergétiquement favorable. Les enzymes sont des structures phénoménales qui n'ont cessé d'étonner les biochimistes jusqu'à nos jours et ceci pour les raisons suivantes:

- Premièrement, les enzymes sont de formidables catalyseurs dont certains peuvent transformer jusqu'à plusieurs millions de molécules *par seconde.*

[1] Discours inaugural du 3.12.1992.

[2] Abréviations: GPI = glycosylphosphatidylinositol, RER = reticulum endoplasmique rugueux, TV = transport vésiculaire.

- Deuxièmement, leur activité est hautement spécifique puisque chaque enzyme ne transforme qu'un seul type de molécules, ce qui permet à des centaines de réactions diverses catalysées par différentes enzymes d'avoir lieu en même temps dans un même compartiment de la cellule.
- Troisièmement, beaucoup d'enzymes sont capables d'interagir non seulement avec les molécules qu'elles transforment, mais aussi avec un ou plusieurs autres métabolites, interaction qui peut soit arrêter, soit augmenter l'activité catalytique de l'enzyme et ainsi adapter son activité aux besoins précis de la cellule. De cette manière, sans qu'il y ait un centre de commande, les enzymes subordonnent leurs activités aux besoins de la cellule où ils se trouvent.

C'est donc très compréhensible que les enzymes aient pu attirer les efforts de plusieurs générations de biochimistes et continuent à le faire de nos jours. Pourtant, nombre de chercheurs d'aujourd'hui choisissent d'étudier des phénomènes bien plus complexes encore qu'une catalyse enzymatique. C'est la microscopie électronique qui a commencé dans les années soixante à apporter la lumière sur l'architecture interne de la cellule, architecture complexe qui n'a pas tardé à intéresser les biologistes et biochimistes. Une des structures les plus saillantes sont les membranes apparaissant

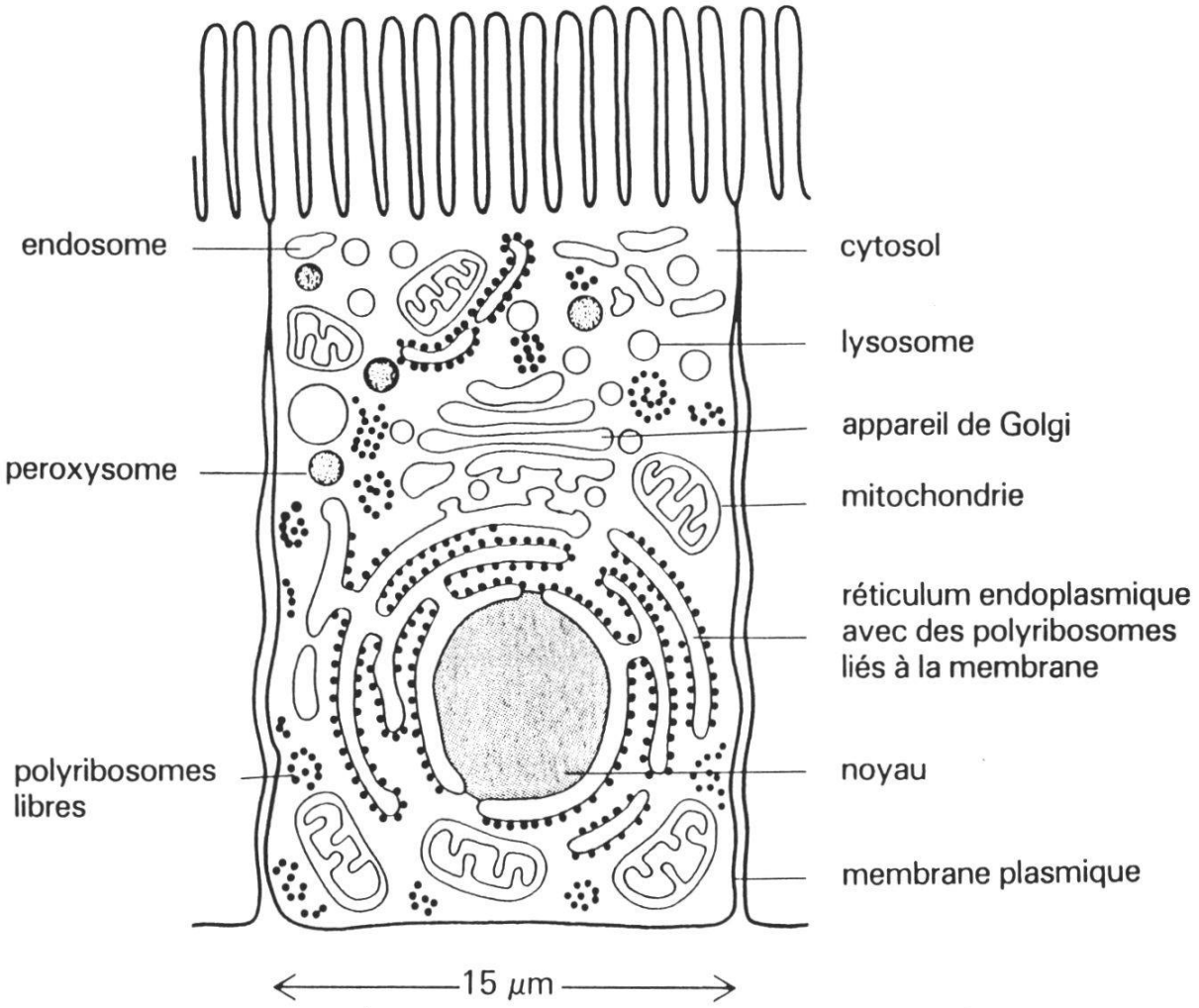

Fig. 1: Cellule eukaryote.

comme des lignes noires entourant les cellules et se trouvant aussi à l'intérieur de la cellule. Ceci suggère que la cellule eukaryote est subdivisée en différents compartiments. Ceci est montré en deux dimensions sur la Fig. 1 qui pourrait être l'image microscopique d'une fine tranche prise du milieu d'une cellule.

En effet, il s'agit de compartiments clos qu'on appelle réticulum endoplasmique rugueux (RER), appareil de Golgi, lysosomes, mitochondries, péroxysomes, etc. Ils sont entourés du cytoplasme, un compartiment ouvert, qui entoure tous les autres compartiments. Ce qui nous intéresse ici c'est le RER et le Golgi. Le RER est un système de sacs et de tubes communicant entre eux, ce qui donne, si l'on regarde une fine tranche de la cellule au microscope électronique, cette apparence de saucisses. Les protéines à l'intérieur du RER sont complètement séparées et différentes des protéines du cytoplasme. Le RER est le compartiment où sont élaborées les protéines destinées à l'espace extracellulaire, p. ex. les enzymes de la lumière des intestins qui permettent la digestion, les protéines du lait maternel, les hormones, etc. La cellule eukaryote a donc besoin d'un mécanisme qui permet aux protéines ayant passé la membrane du RER d'être transportées à l'extérieur. Cette étape de transport depuis le RER vers l'extérieur est régie par un mécanisme appelé «transport vésiculaire» (TV). Le TV est illustré sur la Fig. 2.

Il est remarquable que le transport du RER vers la surface ne se fasse pas en une seule étape, mais comprenne plusieurs étapes intermédiaires. Ainsi, il y a des vésicules contenant des protéines destinées à la sécrétion qui se détachent du RER pour fusionner avec le premier compartiment de l'appareil Golgi appelé Gis-Golgi. Ce compartiment ne communique pas avec les autres sacs du Golgi. Il y a donc des vésicules qui se détachent du Cis-Golgi à leur tour pour fusionner avec le prochain compartiment du Golgi. Les étapes suivantes sont le compartiment appelé Golgi intermédiaire, puis le Trans-Golgi, ensuite le réticulum transgolgien d'où des vésicules se détachent pour finalement fusionner avec la membrane plasmique où le contenu est relâché à l'extérieur. Il n'y a donc à aucun moment une communication ouverte entre deux organelles consécutives de ce parcours et chaque étape est franchie par l'intermédiaire d'un TV durant lequel les protéines à sécréter restent séparées du cytoplasme contenant les protéines qui doivent rester à l'intérieur de la cellule. Ce qui est remarquable, c'est le débit vésiculaire. On a calculé que dans une cellule engagée dans la sécrétion il y aurait entre 1000 et 3000 vésicules quittant le RER par seconde. Ayant établi le modèle de TV, les biologistes et biochimistes essaient aujourd'hui de répondre à des questions qui en découlent:

1. Quelles sont les structures voire les protéines permettant la formation, le détachement et le transport de vésicules?

2. Quelles sont les protéines qui permettent l'attachement spécifique de vésicules à une membrane destinataire à chaque étape de la voie de secrétion? (Il faut postuler des mécanismes de reconnaissance spécifique entre des vésicules et des membranes destinataires, parce que la séquence des étapes à parcourir est rigoureusement observée. Par exemple, une vésicule partant du RER ne peut en aucun cas fusionner avec la membrane plasmique ou un lysosome, etc., mais va diffuser jusqu'à ce qu'elle trouve une membrane appartenant au Cis-Golgi où elle pourra se fixer et

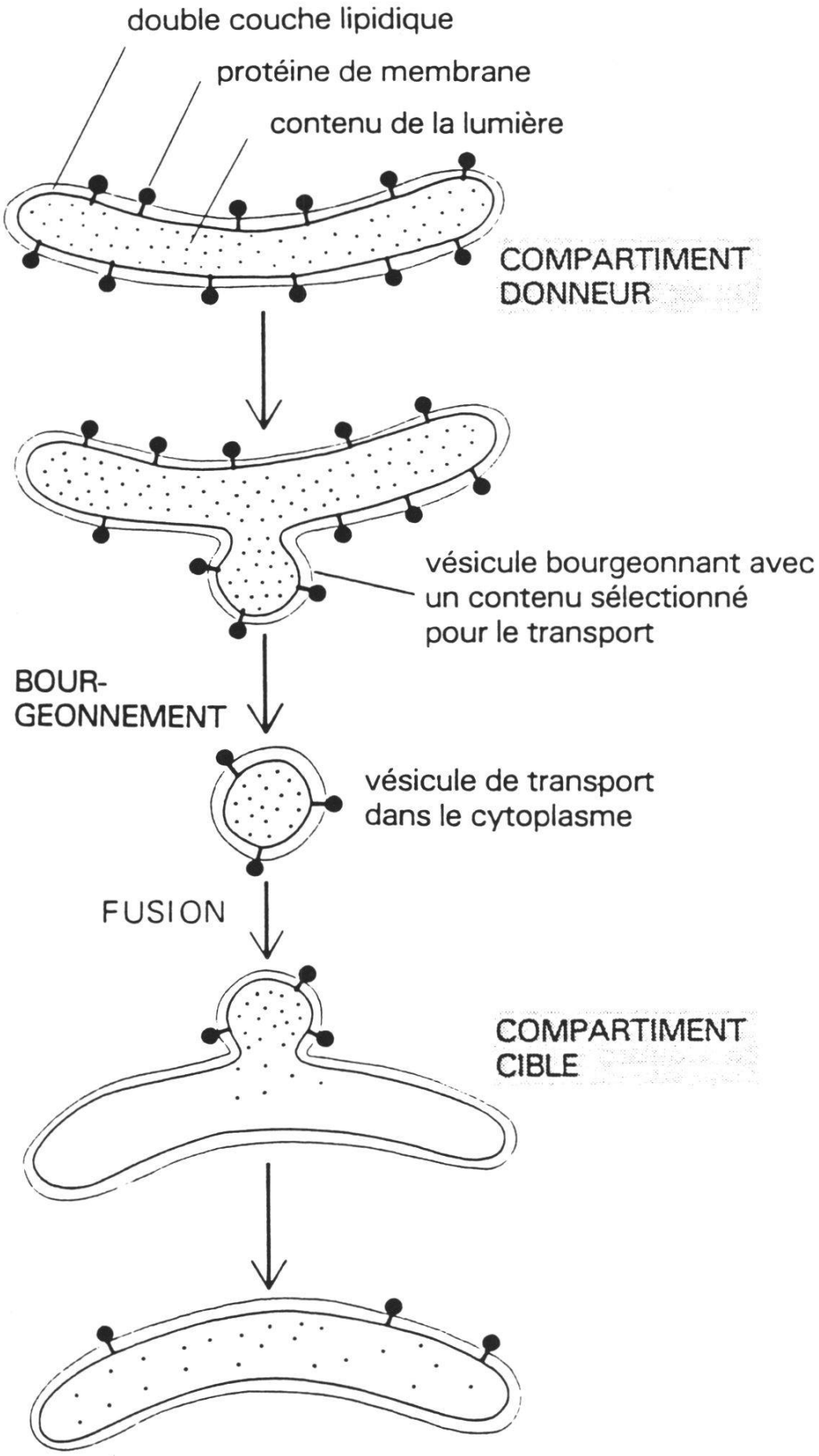

Fig. 2: Transport vésiculaire.

fusionner. La question se pose donc: quels sont les molécules et mécanismes permettant la reconnaissance de membranes destinataires à chaque étape?)

3. Quelles sont les protéines permettant la fusion de vésicules avec la membrane destinataire à chaque étape de la voie de sécrétion?

4. Quelles sont les empreintes moléculaires sur les protéines transportées déterminant la voie empruntée? Pour comprendre cette question, il faut prendre en considération qu'une protéine à l'intérieur du RER peut en effet emprunter plusieurs voies:

a. Elle peut rester dans le RER. On connaît plusieurs protéines solubles aussi bien que membranaires qui restent dans le RER à jamais.

b. Une protéine peut passer au Golgi mais rester dans un des différents compartiments de cette organelle comme c'est le cas p. ex. pour un grand nombre d'enzymes attachant des sucres à des protéines.

c. Arrivées au niveau du Trans-Golgi et du réticulum transgolgien, les protéines ont à choisir entre trois voies qui peuvent être opérationnelles toutes les trois dans une même cellule; une voie est celle de la sécrétion constitutive, qui amène directement à la membrane plasmique; une autre voie amène aux lysosomes qui sont les organelles dans lesquelles des biopolymères, comme par exemple des bactéries, sont digérées par des enzymes dites lysosomiales: ce chemin est donc emprunté par les enzymes lysosomiales qui, elles aussi, sont d'abord synthétisées dans le RER, puis amenées au lysosome par le TV. Un autre chemin encore est celui qui amène aux granules de stockage où des protéines peuvent rester entreposées jusqu'à ce qu'un signal hormonal déclenche la fusion de ces granules avec la membrane plasmique. Le contenu est alors sécrété. On croit que dans tous ces moments de «choix» ce sont des signaux portés par les molécules elles-mêmes qui sont reconnus par des mécanismes de triage qui séparent ainsi des molécules destinées à différents compartiments. Plutôt que de vous donner un résumé global de tout ce que l'on connaît par rapport à ces questions, j'aimerais essayer de vous familiariser avec trois des approches expérimentales les plus fructueuses utilisées aujourd'hui pour identifier les protéines impliquées dans le processus du TV.

1. La microscopie électronique elle-même a permis de trouver des protéines impliquées dans la formation des vésicules. Cette technique a montré qu'au moment de la formation de vésicules il y a une apposition d'une protéine d'une apparence caractéristique du côté cytoplasmique de la membrane.

   La Fig. 3 permet de voir du côté cytoplasmique les vésicules en formation. On peut discerner cette structure caractéristique nommée une cage. Il a été possible d'utiliser cette apparence microscopique lors de la purification des protéines formant cette cage, et l'analyse biochimique de ce matériel a décelé que la protéine principale est une protéine soluble dans le cytoplasme. Elle polymérise sur les membranes au moment de la formation de vésicules tout en formant ces cages. Cette

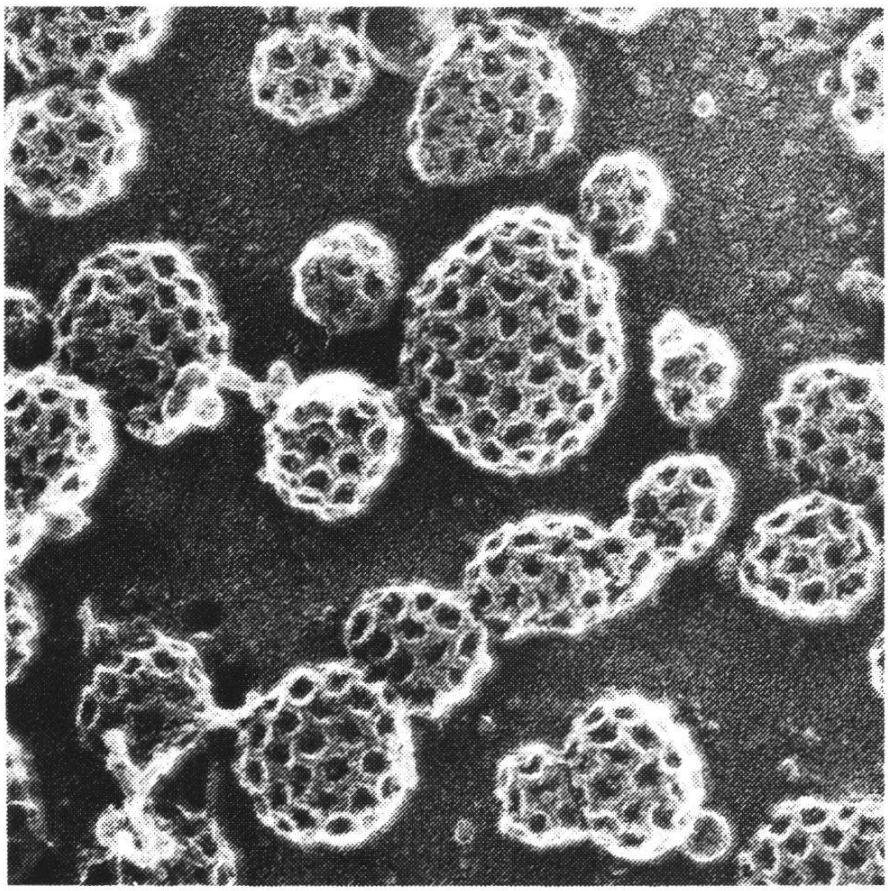

Fig. 3: Vésicules en formation vues du côté cytoplasmique.

protéine est appelée la clathrine. Il faut préciser que cette clathrine, ainsi qu'une série de protéines permettant l'attachement de la clathrine à la membrane de la vésicule en formation, intervient seulement à une seule étape de la voie de sécrétion, c'est-à-dire quand les vésicules se forment au niveau du Trans-Golgi. Par contre, il y a d'autres protéines avec une fonction analogue en d'autres endroits de la voie de sécrétion. Le rôle exact de la clathrine n'est toujours pas connu.

Pourtant, on s'attendait à ce que le phénomène du TV implique une multitude d'autres protéines qu'on ne peut identifier à leur seule apparence microscopique. Comment allait-on les identifier?

2. Des tentatives acharnées à reproduire le transport vésiculaire *in vitro,* c'est-à-dire après homogénéisation des cellules, ont permis d'emprunter l'approche classique (homogénéisation, test *in vitro,* purification, analyse) qui a été si fructueuse pour l'étude des enzymes. Après avoir testé mille et une méthodes d'homogénéisation, il a en effet été possible d'en trouver une qui permette de préserver les éléments nécessaires au TV dans un état fonctionnel. Quand on homogénéise la cellule de cette manière, chaque organelle telle que le RER ou le Golgi forme immédiatement des petites vésicules qui retiennent à l'intérieur les protéines se trouvant dans cette organelle et contenant aussi le cargo à transporter. Dans cet homogénat, le TV peut être démontré et mesuré en exploitant le fait qu'il y a de nombreuses modifications de protéines en voie de sécrétion qui s'effectuent uniquement dans l'un ou l'autre

compartiment de l'appareil de Golgi. (Une de ces modifications consiste par exemple en l'attachement de certains sucres). Si les conditions sont bien choisies, une telle modification de protéines intervenant pendant l'incubation d'un homogénat peut devenir une mesure de l'arrivée des protéines dans ce compartiment par TV. Utilisant un test *in vitro* basé sur ce principe, il a pu être démontré que le TV, à côté des vésicules donneurs et accepteurs, est dépendant de la présence de cytosol, d'énergie sous forme d'adénosine-triphosphate et d'une autre substance appelée guanosine-triphosphate. Ce test de TV reconstitué *in vitro* a ensuite permis de purifier des facteurs du cytoplasme nécessaires pour le TV, notamment une protéine nommée NSF. Les études consécutives ont permis de dire que le NSF est requis au moment précis de la fusion des vésicules de transport avec une membrane acceptrice. Lors de son activité, le NSF utilise de l'énergie en hydrolysant de l'adénosine-triphosphate. Il est indispensable à toutes les différentes étapes du TV. En étudiant ce NSF, Jim Rothman, le protagoniste de cette approche, a réussi à purifier d'autres protéines cytoplasmiques interagissant avec le NSF nécessaire à son activité. Ceci est l'expérience constante du biochimiste: la connaissance d'un élément important permet souvent d'en découvrir d'autres. Bien que cette approche ait été fructueuse pour la purification de facteurs cytoplasmiques, il est évident qu'elle ne pouvait pas nous révéler l'identité d'éventuelles protéines membranaires utiles à ce processus. Pour cela il aurait fallu solubiliser les éléments des membranes, purifier les composantes (protéines) actives et reconstituer de nouvelles membranes. Ces dernières seraient ensuite testées comme compartiment donneur ou accepteur dans un test de TV *in vitro.* Personne n'a tenté de développer l'approche classique jusqu'à ce stade.

3. Toutefois, ces facteurs membranaires ont pu être mis en évidence par une approche très différente, celle du généticien, qui passe par la production de mutants déficients dans le TV. Cette démarche a encore pour but d'identifier, par le clonage des gènes correspondants, des protéines dont au départ on ne connaît strictement rien. Cette approche est illustrée sur la Fig. 4.

   En ajoutant un mutagène à une population de cellules de levures ou de cellules mammifères, on augmente la fréquence de mutations dans l'ADN, substance porteuse de l'information génétique. On teste ensuite la capacité de sécrétion de chaque cellule dans cette population mutagénéisée. Il se peut qu'une cellule sur mille ne pourra pas parcourir ce TV et ne sécrétera plus de protéines parce qu'un gène essentiel pour le TV a été touché. C'est là toute la difficulté de l'approche, puisqu'il est important de pouvoir tester («screener») rapidement un grand nombre de cellules et d'évaluer leur capacité à sécréter des protéines. Une fois cette étape franchie, on isole la cellule déficiente en sécrétion et on la laisse se multiplier pour en obtenir un grand nombre de cellules identiques auxquelles, selon toute probabilité, il manquera une protéine X, inconnue, mais importante à la sécrétion. A ce stade, on introduit dans les cellules mutées une librairie de gènes, librairie contenant l'ensemble de tous les gènes d'une cellule normale, mais sous forme fragmentée de manière à ce que chaque pièce de cette librairie contienne seulement 1 à 2 gènes. L'introduction de cette collection dans les mutants sous forme de plasmides est appelée transfection et procède de manière à ce que chaque cellule ne reçoive en moyenne qu'un seul gène. A la suite de cette transfection, seule la cellule qui aura

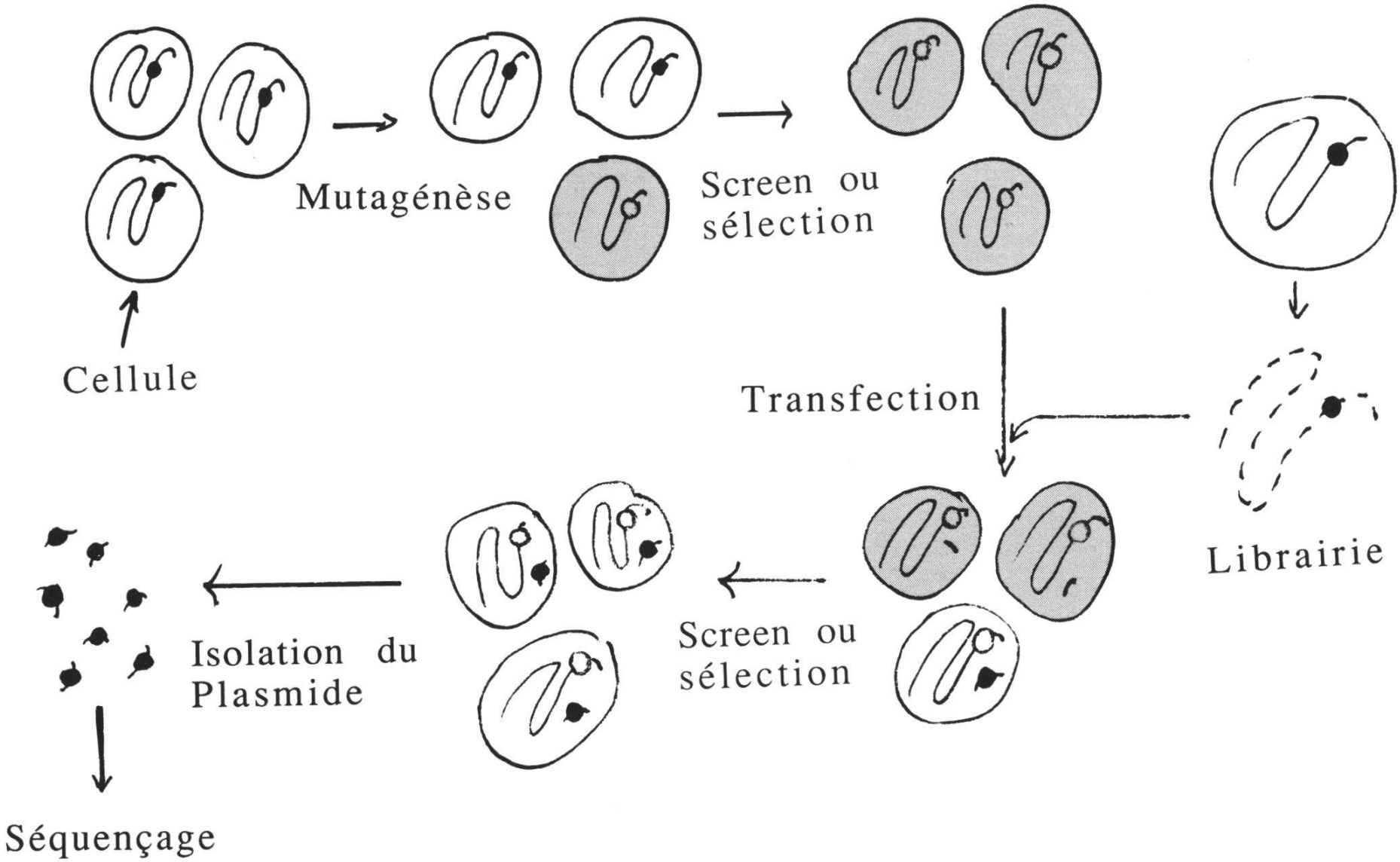

Fig. 4: ● = gène, ○ = gène muté, = plasmide contenant un gène.

reçu le gène pour la protéine X reprendra la sécrétion. Il s'agit donc à nouveau de détecter et d'isoler cette cellule guérie et de la laisser se multiplier. Ensuite on isole des cellules guéries le plasmide contenant le gène pour la protéine X dont on peut maintenant déterminer la structure par séquençage. On obtient donc la séquence d'une protéine qui est nécessaire à la sécrétion et dont on ignorait l'existence même au départ. De cette manière une bonne quarantaine de protéines nécessaires au TV ont été séquencées au cours des dernières années. Que nous apprennent ces séquences? A l'heure actuelle, aucun programme informatique ne nous permet de dessiner la structure tridimensionnelle d'une protéine à partir d'une séquence, et même si ceci était possible, cette structure ne nous révélerait pas le mode de fonction de cette protéine dans le contexte du TV. Pourtant, l'introduction de la séquence d'une protéine nouvelle dans une banque de données contenant les séquences d'autres protéines permet souvent de trouver des homologies avec des protéines, dont la structure et la fonction sont connues et, par ce biais, de formuler une hypothèse quant au mode de fonctionnement d'une protéine nouvellement séquencée. On peut ainsi affirmer que plusieurs des protéines nécessaires au TV sont semblables à des protéines G, c'est-à-dire à des protéines jouant un rôle dans la réponse des cellules aux hormones. Les protéines G, d'une manière générale, sont considérées comme des amplificateurs biochimiques qui utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse du guanosine-triphosphate pour amplifier un signal primaire tel que, par exemple, le changement de conformation survenu dans un récepteur lors de la liaison d'une hormone. Il est remarquable que chacune de ces protéines G soit utile à une étape différente du TV. Leur rôle dans ce processus a été totalement inattendu et a stimulé ainsi la recherche d'autres protéines de ce type qui toutes semblent être impliqués dans le TV. On a aussi constaté p. ex. qu'une protéine capable de transporter des lipides membranaires un par un d'un compartiment à l'autre à travers le cytoplasme est indispensable au TV entre différents compartiments du Golgi. Le temps ne me permet pas de m'étendre plus longtemps sur d'autres homologies entre des protéines identifiées par l'approche du généticien et des protéines connues. Cependant chaque fois il en résultait des concepts inattendus et des hypothèses nouvelles.

Une extension puissante de l'approche génétique est de produire des mutations suppresseurs. Cette approche exploite le fait que souvent les protéines impliquées dans un processus X ont des interactions mutuelles semblables à celles d'une serrure avec sa clef. Imaginons qu'une première mutation ait inactivé un processus X en modifiant la structure d'une protéine appelée «clef». L'effet négatif de cette mutation sur le processus X peut être surmonté par une deuxième mutation (appelée mutation suppresseur) dans la protéine «serrure» si cette deuxième mutation réadapte la «serrure» à la «clef» altérée par la première mutation. Il est possible d'isoler le gène contenant la mutation suppresseur d'une manière analogue à celle montrée dans la Fig. 4 et il devient donc possible de passer d'un élément connu à d'autres, inconnus, avec lesquels le premier interagit.

Cette approche du généticien du clonage par complémentarité de mutants est donc à l'heure actuelle utilisée avec beaucoup de succès dans différents domaines de la biochimie et surtout dans l'étude de phénomènes complexes qui ne sont pas facilement abordables par les méthodes classiques de la biochimie.

Dans une dernière partie j'aimerais vous présenter en quelques mots les recherches qui se poursuivent actuellement dans mon laboratoire et dont certaines portent de manière indirecte sur quelques problèmes abordés jusqu'ici. Nous nous intéressons à la biosynthèse et au trafic intracellulaire d'une classe de protéines membranaires qui se distinguent par la manière dont elles se fixent à la membrane.

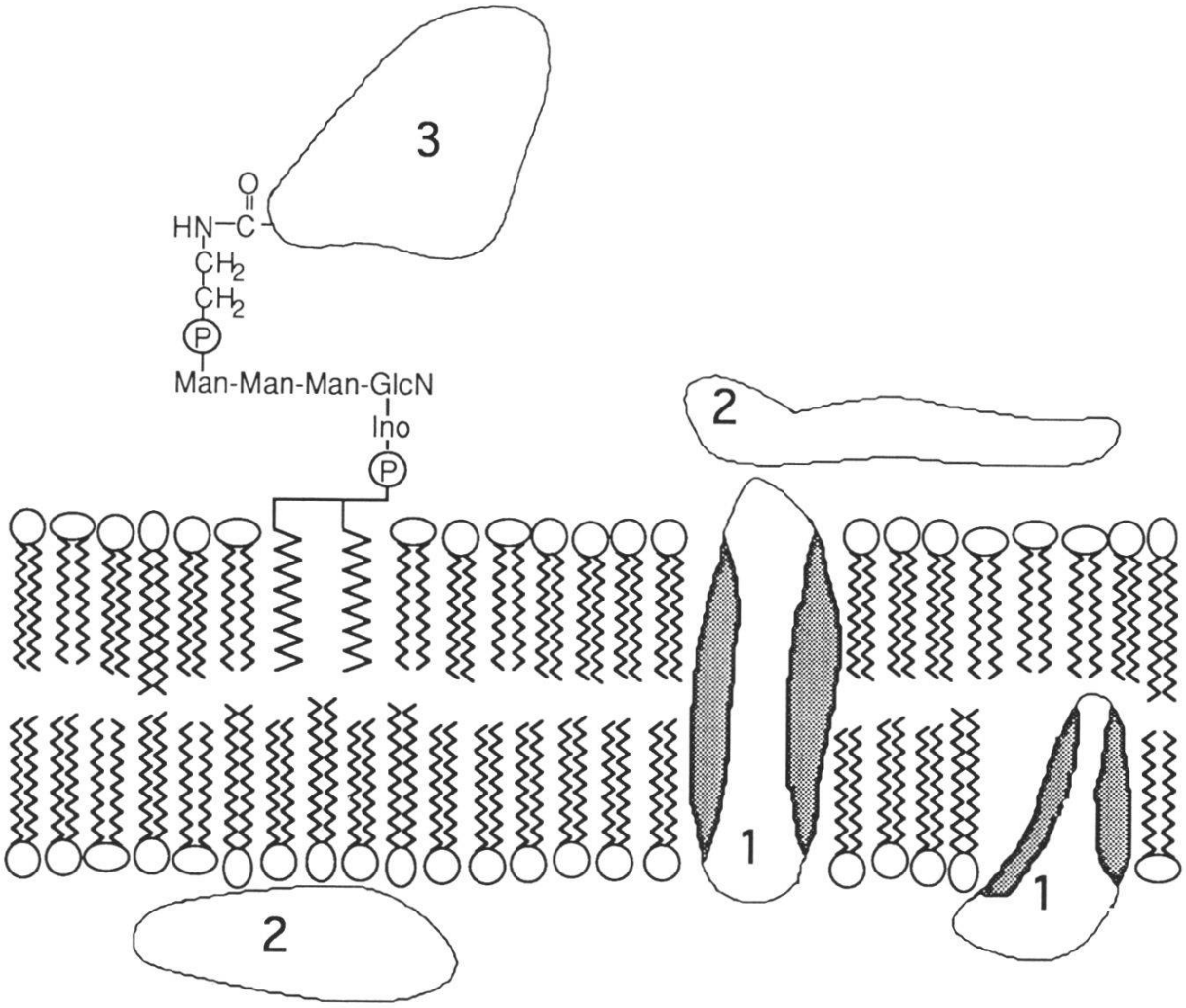

Fig. 5: 1 = Protéines ancrées de manière classique par des zones d'acides aminés hydrophobiques (en gris); 2 = protéines rattachées à la membrane par des interactions non-covalentes; 3 = protéine ancrée par un glycosylphosphatidylinositol. = symbole pour les phospholipides formant la bicouche lipidique des membranes. Man = mannose, GlcN = glucosamine, Ino = inositol, P = phosphate.

Tandis que la plupart des protéines membranaires sont retenues dans la membrane hydrophobe par une suite d'acides aminés eux-mêmes hydrophobes traversant la double couche de phospholipides, ces protéines sont simplement rattachées à un phospholipide de la couche extérieure de la membrane. Le lien entre le phospholipide et la protéine est constitué d'une chaîne de sucres appelés glucosamine et mannose et

d'un élément nommé inositol (Fig. 5). La structure globale, appelée glycophosphatidylinositol ou GPI, est pratiquement la même pour tous les organismes qui ont été étudiés depuis la levure jusqu'aux mammifères. Les problèmes que nous étudions actuellement dans la levure sont les suivants:

1. Dans quelle partie de la cellule se trouvent les différentes protéines ancrées par un GPI?
2. Par quelle voie vésiculaire arrivent-elles à la surface? (Plusieurs voies alternatives existent dans la levure.)
3. Quels sont les enzymes qui synthétisent le GPI?
4. Pourquoi et comment les lipides de l'ancre sont-ils remplacés par d'autres lipides pendant le transport de ces protéines vers leur destination?
5. Quand le trafic vésiculaire est arrêté, la synthèse d'une importante classe de lipides membranaires s'arrête également. Quel est le rapport entre la synthèse de lipides et le trafic vésiculaire? Ce dernier est-il dépendant de la synthèse de certaines classes de lipides?

Pour terminer, j'aimerais tirer quelques conclusions. Nous pouvons constater que la biochimie a évolué dans de nouvelles directions. Tandis que les biochimistes s'occupaient traditionnellement des enzymes, nombre d'entre eux se sont tournés aujourd'hui vers des phénomènes de la biologie cellulaire. Dans cet exercice, la biochimie profite de la vaste expérience acquise à travers l'étude des enzymes. En même temps, la biochimie d'aujourd'hui est en train de se confondre et de s'associer avec d'autres branches des sciences naturelles comme la biologie, l'histologie, la physiologie, la microscopie électronique et la chimie, disciplines qui s'unissent et s'entraident dans le but commun d'essayer de décrire les phénomènes de la vie au niveau des molécules.